



①9 **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Übersetzung der  
europäischen Patentschrift**

⑨7 **EP 0 718 406 B 1**

⑩ **DE 695 20 335 T 2**

⑤1 Int. Cl. 7:  
**C 12 P 19/14**  
C 12 N 9/42  
A 22 C 13/00

②1 Deutsches Aktenzeichen: 695 20 335.5  
⑨6 Europäisches Aktenzeichen: 95 850 219.7  
⑨6 Europäischer Anmeldetag: 7. 12. 1995  
⑨7 Erstveröffentlichung durch das EPA: 26. 6. 1996  
⑨7 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 14. 3. 2001  
④7 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 9. 8. 2001

③0 Unionspriorität:

946053 23. 12. 1994 FI

⑦3 Patentinhaber:

Eriksson Capital AB, Mariehamn-Aland, FI

⑦4 Vertreter:

Tiedtke, Bühling, Kinne & Partner, 80336 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC,  
NL, PT, SE

⑦2 Erfinder:

Viikari, Liisa, FIN-00200 Helsinki, FI; Ojamo, Heikki,  
FIN-08150 Lohja, FI; Johansson, Tor, FIN-10650  
Tammisaari, FI; Mustranta, Annikka, FIN-2180  
Espoo, FI; Itävaara, Merja, FIN-02400 Kirkkonummi,  
FI

⑤4 Verfahren zur Zersetzung von Wursthäuten und anderen celluloseartigen Substanzen mittels einer  
Enzymlösung

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**DE 695 20 335 T 2**

**DE 695 20 335 T 2**

14.03.01

E 27449

5 Deutschsprachige Übersetzung der Beschreibung  
der Europäischen Patentanmeldung Nr.95 850 219.7  
des Europäischen Patents Nr. 0 718 406

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Zerstörung von  
Wursthäuten und anderen hauptsächlich zellulosehaltigen  
10 Substanzen durch Zersetzung in einer Enzymlösung.

In dieser Anmeldung bedeutet der Ausdruck "Wursthaut"  
eine fasrige Umhüllung oder eine Zellulose- oder  
Zellophan®-Umhüllung oder irgendeine andere auf Zellulose  
15 basierende Umhüllung.

Die Veröffentlichung "Industrielle Enzyme" (Edition 1,  
1979, H. Ruttloff et al. "Industrielle Herstellung und  
Verwendung von Enzympräparaten", Seiten 286-297)  
20 beschreibt die Verwendung von Zellulose-Spaltungsenzymen.  
Der Aufbau und die Art der Wirkung der Zellulase-Enzyme  
sind beschrieben. Weiterhin ist die Verwendung von  
Zellulase-Enzymen zum Beispiel in der Lebensmittel- und  
Brauereiindustrie beschrieben.

25 Ghose T.K. und I.A. Kostrick, Biotechnol Bioengng. 12  
(1970), Seiten 921-246 offenbart ein Verfahren zur  
Zerstörung von Zellulase-Substanzen durch Zersetzung mit  
einer Enzymlösung. Die Trennung der Produktlösung findet  
30 durch ein osmoseartiges Verfahren unter Verwendung einer  
Ultrafiltrationsmembran statt. Verglichen mit dem  
Verfahren der vorliegenden Erfindung hat dieses Verfahren  
Nachteile, wie etwa dass es teurer ist, eine geringere  
Produktivitätsrate besitzt und umständlicher ist.

35 Umhüllungen aus Zellulosematerial für schlauchförmige  
Lebensmittelprodukte werden wohl bekannt zur Verpackung

verarbeiteter Fleischprodukte, wie etwa z.B. Würste, verwendet.

In den Wurstfabriken besteht das Bedürfnis, Wursthäute wegen der großen Abfallmenge, die diese verursachen, zu zerstören bzw. abzubauen. Bis jetzt haben sie sich der Häute einfach durch Wegbringen zum Abfall entledigt. Ein gewöhnliches Verfahren ist auch die Kompostierung von diesen unter nassen Bedingungen, welches schwierig ist, da verschiedene Faktoren, wie etwa die Sauerstoffverfügbarkeit und die Temperatur eingestellt werden müssen. Ein früher verwendetes Verfahren ist auch die Verbrennung von diesen.

Die Verfahren des Stands der Technik haben Nachteile. Zum Beispiel verursachen sie entweder große Abfallmengen, weisen lange Reaktionszeiten auf oder sind nicht ökonomisch. Daher besteht ein Bedürfnis für ein Verfahren zur Zerstörung von zellulosehaltigen Substanzen auf ökonomische Weise. Dieses Problem wird durch die vorliegende Erfindung gelöst, in welcher die Zellulase-Enzyme, die den Abbau der zellulosehaltigen Substanzen verursachen, auf ökonomische Weise wiedergewonnen werden.

Die Aufgabe der Erfindung ist die Zerstörung der Wursthäute mittels Enzymhydrolyse durch ein ökonomisches Verfahren.

Folglich wird das Verfahren der Erfindung durch die folgenden Verfahrensstufen gekennzeichnet:

- a) Zellulase-Enzyme werden zu einer Wasserlösung enthaltenden Reaktor hinzugefügt,
- b) vor Stufe a) oder nach dieser werden die zu zersetzenden Substanzen zu dem Reaktor hinzugefügt,

14.03.01

- 3 -

- c) die zu zersetzenden Substanzen werden einer vollständigen oder teilweisen Zersetzung überlassen, danach
- 5 d) wird eine neue Menge an zu zersetzenden Substanzen zu dem Reaktor hinzugefügt, und
- e) wenn die Enzyme an die neuen zu zersetzenden Substanzen adsorbiert worden sind, werden die in der
- 10 Lösung enthaltenen Substanzen, welche in Stufe c) gelöst worden sind, wiedergewonnen, indem die Lösung und die zu zersetzenden Substanzen voneinander getrennt werden, wobei
- 15 f) Wasser zu den zu zersetzenden Substanzen hinzugefügt wird und wenn gewünscht, Verfahrensstufen c-f so oft wie gewünscht wiederholt werden.
- Folglich gewährleistet die Erfindung ein ökonomisches
- 20 Verfahren zur Zersetzung von Häuten mittels Enzymen, und soweit die Enzyme zurückgewonnen werden, werden sie bei der folgenden Zersetzung wiederverwendet. In der Praxis besteht jedoch gewöhnlich ein gewisser Verlust an Enzymen, aus welchem Grund eine gegebene Menge von
- 25 Enzymen vorzugsweise in irgendeiner Verfahrensstufe zu dem Reaktor hinzugefügt wird. Diese Menge ist jedoch verglichen mit der benötigten Gesamtmenge in der Hydrolyse gering.
- 30 In dem Verfahren der Erfindung werden die zu zerstörenden Häute und möglicherweise andere zellulosehaltige Substanzen in einem Reaktor gelöst, der eine Enzymlösung enthält. Die Enzyme haften dann an der Wursthaut und eine Hydrolysereaktion zur Zersetzung von diesen beginnt.
- 35 Diese Reaktion wird fortgesetzt bis ein benötigter Teil

der zu zersetzenden Häute, vorzugsweise alle von diesen, zersetzt worden sind, wonach eine neue Menge von zu zerstörenden Häuten zu dem Reaktor hinzugefügt wird, wobei die Enzyme an den neuen Häuten adsorbiert werden.

- 5 Die Zersetzungsprodukte der Häute, mit anderen Worten die Zucker, sind in der Lösung, die von dem Reaktor wiedergewonnen wird. Diese Zersetzungsprodukte, welche häufig einfach als reduzierende Zucker gemessen werden, bestehen hauptsächlich aus Oligo- und Monosacchariden,  
10 die zuletzt Erwähnten hauptsächlich aus Glukose.

- In einer Ausführungsform des Verfahrens, kann das Verfahren folglich z.B. zur Herstellung von Glukose verwendet werden, welche als Nebenprodukt erhalten wird,  
15 wenn die Häute zerstört werden.

- In dem Verfahren kann die Zerstörung der Häute als eine Funktion der Zeit und der Enzym- und/oder Hautkonzentration und/oder durch Festlegung der  
20 Konzentrationen an Glukose und an reduzierenden Zuckern und auch der Menge an unlöslicher Trockenmasse abgeleitet werden.

- Die verwendeten Enzyme sind Zellulase-Zubereitungen,  
25 vorzugsweise kommerzielle und leicht erhältliche, welche Zellulose in Kohlenwasserstoffe von geringerem Molekulargewicht als Zellulose aufspalten. Die Zusammensetzung des Endprodukts und der Anteil an Glukose in den gelösten Kohlenwasserstoffen hängt von dem  
30 Verhältnis der verschiedenen Aktivitäten der verwendeten Zellulase-Zubereitungen ab.

- Wenn das Verfahren gleichzeitig zur Herstellung von Glukose verwendet wird, wird bevorzugt auch  $\beta$ -  
35 Glukosidaseenzym zu dem Reaktor hinzugefügt, da diese

14.03.01

- 5 -

Glukose aus Zellobiose-Disaccharid und Oligosacchariden herstellt. Die  $\beta$ -Glukosidase verhindert auch eine Inhibierung der Zellulasen wegen der Zellobiose. Da  $\beta$ -Glukosidase nicht an den Wursthäuten anhaftet, wird diese  
5 bevorzugt auf einem Feststoffträger befestigt. Die Verwendung von solch einer immobilisierten  $\beta$ -Glukosidase ermöglicht es auch, dieses Enzym in den Kreislauf zurückzuführen.

10 Abhängig von der Konzentration der Enzyme und der Häute, können die Häute in 2-5 Stunden zersetzt werden. In der Praxis wird die Hydrolysezeit durch eine geeignete Dosis der Enzyme ausgewählt, auch gemäss dem, was in der Fabrik bevorzugt ist, wobei die Kosten der Apparate, die Menge  
15 an Häuten und die Zugabe dieser und auch die Enzymkosten berücksichtigt werden.

Um die Enzymkosten zu reduzieren, werden die Zellulasen bevorzugt in einer semi-kontinuierlichen Chargenhydrolyse  
20 in den Kreislauf zurückgeführt, so dass die Enzyme nach der Hydrolyse an neue Häute gebunden werden und die wiedergewonnene Zuckerlösung wird bevorzugt durch eine Puffer- oder Wasserlösung für die nachfolgende Hydrolyse ersetzt. Die Hydrolyse funktioniert für mehrere Wochen  
25 mit dem gleichen Effekt und bei nur geringer ersetzender Enzymzugabe. Auch wird eine Zugabe von  $\beta$ -Glukosidase benötigt, um das Hydrolyseniveau konstant zu halten, da diese nicht auf den Häuten haftet und folglich nicht wiederverwendbar ist. Da die  $\beta$ -Glukosidase jedoch an  
30 einen festen Träger gebunden ist, kann die gleiche Enzymcharge in einigen Wochen in einer semi-kontinuierlichen Hydrolyse in den Kreislauf zurückgeführt werden, ohne die Zuckerausbeuten zu reduzieren. Folglich kann der daraus folgende Enzymverbrauch aus den semi-  
35 kontinuierlichen Hydrolysetests berechnet werden, wenn

eine neue Enzymzugabe (30 FPU Econase® und 100 nkat  $\beta$ -Glukosidase/g Haut) jeden 150-igsten Tag ausgeführt wird.

|  |                 |
|--|-----------------|
| Econase®:                              | 0,7 FPU/g Haut  |
| 5 Immobilisierte $\beta$ -Glukosidase: | 6,7 nkat/g Haut |

nkat = Nanokatal, eine Einheit der Enzymaktivität. Ein Nanokatal stellt ein Nanomol des Reaktionsprodukts in einer Sekunde her, baut ab oder wandelt um jeweils ein  
 10 Nanomol des Startmaterials in einer Sekunde unter den in dem Analyseverfahren verwendeten Bedingungen.

Der Bedarf nach einer vollständig neuen Enzymzugabe hängt von vielen praktischen Faktoren in der Fabrik ab. Diese  
 15 sind z.B. die Inaktivierung und der Enzymverbrauch, der Niederschlag der Häute, die Hydrolysezeit, die Tatsache, dass der Apparat verschmutzt usw.

Das Reaktionsprodukt kann auch als Futter verwendet  
 20 werden.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Figuren beschrieben. Es ist nicht beabsichtigt, die Erfindung auf  
 Details von diesen zu beschränken.

25 Fig. 1 ist ein schematisches Bild des Erfindungsverfahrens.

Fig. 2 ist ein Flussdiagramm der Verfahrenstufen des  
 30 Erfindungsverfahrens, wobei das Enzym in den Kreislauf zurückgeführt wird.

Fig. 3 ist ein Flussdiagramm der Verfahrensstufen des  
 35 Erfindungsverfahrens ohne irgendeinen Kreislauf der Enzyme oder wenn die Hydrolyse nur einmal ausgeführt

14.03.01

- 7 -

wird.

- In der Praxis können zwei oder mehrere Chargenreaktoren 1 in Übereinstimmung mit Fig. 1 verwendet werden (z.B. 5 m<sup>3</sup>/500 kg Haut/d), wobei die Hydrolysezeit z.B. 24 Stunden oder mehr beträgt. Die Hydrolysezeit kann abhängig von der praktischen Funktion der Fabrik variieren. Die Reaktoren 1 sind bevorzugt Behälter mit einem Mischer 2 und sind mit Ummantellungen 3 (Temperaturregulierung) mit einem Siebboden 4 über den Mischern vorgesehen. Die Reaktoren werden aus einem getrennten Zuführungs-/Hautsammelbehälter 5 entlang Linie 6 beliefert. Wenn die Hydrolyse eines gegebenen Reaktors 1 fertig ist, wird eine neue Charge an Häuten zu dem Hydrolysat hinzugefügt, an welches die Zellulasen adsorbiert werden. Wenn die Adsorption vollständig ist, wird die Vermischung beendet und die Lösung wird durch den Siebboden 4 entlang Linie 7 zu dem Produktionsbehälter 9 abgelassen. Wasser wird zu dem Reaktor entlang Linie 8 zugeführt und die Vermischung und die Hydrolyse wird fortgesetzt. Die immobilisierte  $\beta$ -Glukosidase wird in dem Reaktor durch das Sieb 4 zurückgehalten.
- Alternativ können die unlösliche Trockenmasse, die Häute, an welche die Enzyme gebunden sind, und die immobilisierte  $\beta$ -Glukosidase von dem Hydrolysat durch Zentrifugation, Filtration oder andere bekannte Abtrennungungsverfahren für Trockenmasse abgetrennt werden.
- Die abgetrennte unlösliche Trockenmasse wird dem Reaktor wieder zugeführt, welcher in diesem Fall irgendein Misch-Behälter mit einer Ummantelung ohne einen Zwischenboden ist.
- Die unlösliche Masse wird in gewünschten Intervallen aus



dem Reaktor in einer geeigneten Verfahrensstufe des Verfahrens entladen.

Im folgenden werden Beispiele mit Informationen über

5 Details des Verfahrens angegeben.

### Beispiele

#### 10 Einleitung

Gebrauchte und ungebrauchte Wursthäute wurden enzymatisch mit drei kommerziellen Zellulase-Zubereitungen unter Verwendung von durch Alko hergestellter Econase® und  
15 unter Verwendung von durch Genencor hergestellter Spezyme CE®- und Spezyme CP®-Zellulasen zersetzt. Die Hydrolyse der Häute wurde überwacht als eine Funktion der Zeit und des Enzyms und des Hautgehalts durch Bestimmung der Konzentrationen an Glukose und reduzierenden Zuckern und  
20 der Mengen an unlöslicher und löslicher Trockenmasse. Um die Hydrolyse auszuführen, wurde  $\beta$ -Glukosidaseenzym (Novozym 188®, Novo) auf einen festen Träger befestigt.

#### Die Zusammensetzung der Häute

25

Es waren ziemlich viel Fett (14,9% der Trockenmasse) und Proteine (10,5% der Trockenmasse) in den gebrauchten Häuten vorhanden. Der Anteil der unlöslichen Trockenmasse war geringer und der Anteil der löslichen Trockenmasse  
30 höher als in den ungebrauchten Häuten (Tabelle 1).

14.03.01

- 9 -

Tabelle 1. Die Zusammensetzung der Wursthäute

|                            | ungebrauchte Häute        | gebrauchte Häute          |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Trockenmasse               | 80%                       | 70%                       |
| unlösliche<br>Trockenmasse | 72%                       | 53%                       |
| lösliche<br>Trockenmasse   | 8%                        | 17%                       |
| Fett                       | 0,20% der<br>Trockenmasse | 14,9% der<br>Trockenmasse |
| Protein                    | 0,22% der<br>Trockenmasse | 10,5% der<br>Trockenmasse |

#### Die verwendeten Enzyme

5

In den Zersetzungstests der Häute, wurden kommerzielle Zellulase-Zubereitungen verwendet, in welchen die Aktivitäten der Enzyme in einiger Hinsicht voneinander abweichen (Tabelle 2).

10

#### Die Zellulase-Zubereitungen:

Econase CE® (Alko)

Spezyme CE® (Genencor International)

Spezyme CP® (Genencor International)

15

#### β-Glukosidase:

Novozym 188® (Novo)

Das FPU (die hydrolysierende Aktivität auf dem  
20 Filterpapier) und HEC (die Hydroxyethylzellulose  
hydrolysierende Aktivität) Aktivitäten der Zellulasen-  
Zubereitungen werden als zellulosespeichernde Exo- und  
Endoaktivitäten beschrieben. Die Endoglukanasen spalten  
Bindungen in der Zellulosekette, indem sie  
25 Oligosaccharide verschiedener Größen und die

Exoglukanasen setzen Zellobiose-Einheiten aus den Enden der Ketten frei.  $\beta$ -Glukosidase stellt Glukose aus den Disacchariden und aus den Oligosacchariden her.

5 Tabelle 2. Die Aktivitäten der verwendeten Zellulase Zubereitungen

| Aktivität                            | Econase® | Spezyme<br>CE® | Spezyme<br>CP® | Novozym® |
|--------------------------------------|----------|----------------|----------------|----------|
| FPU U/ml                             | 31       | 49             | 67             | 0,06     |
| HEC<br>nkat/ml                       | 13500    | 16400          | 23100          | 291      |
| $\beta$ -Gluko-<br>sidase<br>nkat/ml | 1028     | 450            | 1078           | 7350     |
| $\beta$ -Gluko-<br>sidase/FPU        | 33       | 9              | 16             |          |
| Protein<br>mg/ml                     | 85       | 109            | 121            | 63       |

### Chargenhydrolyse

10

### Reaktionsbedingungen

Die Chargenhydrolyse der Wursthäute wurden in einem Wasserbad (150 U/min) mit sich schüttelnden konischen

- 15 Flaschen ausgeführt. Der gesamte Inhalt der Flasche wurde als eine Probe genommen, aus welcher der Zucker- und der Trockenmasseinhalt bestimmt wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsmischung betrug:

- 20 1,3 g Haut als Trockenmasse (50-150 g/l)  
19 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5,0  
1 ml Enzymverdünnung

14.03.01

- 11 -

Die Enzyme wurden gemäß der FPU-Aktivität der Zubereitungen (2-30 FPU/g Haut) in die Hydrolysemischungen gegeben.

- 5 Die Reaktionen wurden in einem verdünnten Puffer bei pH 5 ausgeführt, da die Zellulase am besten unter leicht sauren Bedingungen funktionieren. Es ist jedoch nicht notwendig einen Puffer zu verwenden, da der pH der Wasserlösung der Häute ohne irgendeine Einstellung 5  
10 beträgt und sich während der Hydrolyse nicht ändert.

Die Reaktionstemperatur betrug 50°C, welches optimal für die Funktion der Zellulasen ist. Die Temperatur kann auch geringer sein, z.B. 30-50°C.

15

Die gebrauchten Häute wurden genauso wie die ungebrauchten Häute hydrolysiert.

- Das Fett der Häute verblieb an den Wänden des  
20 Reaktionsbehälters und auf der Oberfläche der Flüssigkeit. Das Fett konnte durch ein fettspaltendes Lipaseenzym in Fettsäuren und Glycerin gespalten werden (Candida cylindracea Lipase, Biocatalysts LTD, UK), aber die Fettsäuren verblieben in der Reaktionsmischung  
25 suspendiert, da sie in Wasser unlöslich sind.

- Die Reinigung der Häute hatte keinen Effekt auf das Hydrolyseresultat. Die gesamten Häute (zirka 6 x 30 cm, 15 g/p), genauso wie die kleineren Teilchen (0,5 x 0,5  
30 cm; 1, x 1 cm; 3 x 3 cm) wurden mit Econase® zersetzt.

Effekt der Haut- und Enzymkonzentration

Die Hydrolyse der Wursthäute durch Econase®-Zellulase-Zubereitung und der Effekt der Enzymanwendung als eine  
5 Funktion der Zeit sind in Fig. 4 dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Häute mit dem Erfindungsverfahren sehr gut in zirka 2-5 Stunden zersetzt werden. Die unlösliche Trockenmasse beschreibt  
10 den Anteil, der nicht zersetzt wurde, und bezüglich der Interpretation der Figur wird auf Tabelle 1 verwiesen, wobei dort die anfängliche Zusammensetzung der Häute dargestellt ist.

15 In Fig. 5, wurde die Konzentration der unlöslichen Trockenmasse bei der Hydrolyse dargestellt, wobei der Gehalt an Häuten (gebrauchte Häute) 50, 100 und 150 g/l und die Zellulase Enzymkonzentrationen (Econase®) 2, 5 und 10 FPU/g Haut betrugen. Wenn eine geringere  
20 Enzymdosis verwendet wurde (2-5 FPU/g Haut) oder eine größere Konzentration an Häuten (100-150 g/l), wurde eine längere Reaktionszeit für die maximale Hydrolyse benötigt. Sogar wenn die Zuckeranalyse zeigte, dass die Hydrolyse nicht vollständig war, konnten sichtbare Häute  
25 nur in den 5-Stunden-Proben und in der 24-Stunden-Probe gesehen werden, wobei die Hautkonzentration 150 g/l und die Enzymkonzentration 2 FPU/g betrug.

Wenn die Enzymkonzentration auf 30 FPU/g Haut erhöht  
30 wurde, verkürzte sich die Hydrolysezeit auf 5 Stunden (Fig. 6). Es konnten sogar nach 3 Stunden keine Häute gesehen werden. Es war unlösliche Trockenmasse in einer Menge von 0,3 g/l vorhanden.

14.03.01

- 13 -

Da die Enzymdosis gemäß der FPU-Aktivität unter Verwendung von Spezyme®-Enzymen hergestellt wurde, blieb der Anteil der HEC-Aktivität und  $\beta$ -Glukosidase geringer als mit Econase®. Die Häute wurden sowohl mit Spezyme®-  
5 Enzymen als auch mit der Econase® zersetzt (Fig. 7 und 8).

#### Semi-kontinuierliche Hydrolyse

- 10 In einer semi-kontinuierlichen Hydrolyse, wobei die Enzyme in der Zuckerlösung nach jeder individuellen Chargenhydrolyse wiedergewonnen werden, kann der Verbrauch an Enzymen vermindert werden.
- 15 In einer semi-kontinuierlichen Hydrolyse der gebrauchten Häute (50 g/l Haut, Econase® 30 FPU/g) wurden neue Häute (50 g/l) nach 24 Stunden Hydrolyse in die gleiche Reaktionsmischung hinzugefügt, an welchen es den Zellulasen ermöglicht wurde, sich innerhalb von 20  
20 Minuten zu binden. Die Bindungszeit wurde nicht optimiert. Die Zuckerlösung wurde von der Hautmischung durch Zentrifugation wiedergewonnen (2500 U/min, 10 min) und ein Acetatpuffer wurde stattdessen zugegeben. Es ist auch möglich die Häute durch Filtration wiederzugewinnen.
- 25 Neue Häute wurden wiederum in 24 Stunden hydrolysiert. Da die  $\beta$ -Glukosidase sich nicht an die Zellulose bindet, wurde dieses Enzym in Verbindung mit jedem Pufferwechsel in einer Menge zugegeben, die mit der ursprünglichen  $\beta$ -Glukosidasemenge (1000 nkat/g Haut) übereinstimmte. Der  
30 gleiche Ablauf wurde alle 24 Stunden wiederholt. Die Zuckerausbeute waren nach der zweiten Chargenhydrolyse wegen eines geringen Zellulaseverlusts (Fig. 9) leicht vermindert. Ohne die  $\beta$ -Glukosidasezugabe war die Abnahme sogar schneller (Fig. 10). Der Verlust an Zellulase wurde  
35 durch eine geringe Zugabe von Zellulase substituiert.

Ohne irgendeine substituierende Zellulase-Zugabe funktioniert die semi-kontinuierliche Hydrolyse nicht mit dem gleichen Effekt.

- 5 Um eine geeignete Stufe der Hautzugabe und eine geeignete Hydrolysezeit (50 g/l Häute, Econase® 10 FPU/g) zu finden, wurden die Hautreste von den Hautmischungen nach 2, 4, 6 oder 24 Stunden Hydrolyse abgetrennt und neue Häute wurden zu den Lösungen hinzugegeben. Nach 24
- 10 Stunden Hydrolyse, wurden die Lösungen analysiert. Die Hydrolyse war am besten in der Reaktionsmischung vorangeschritten, wobei die neuen Häute nicht bis 24 Stunden nach dem Beginn der Hydrolyse zugegeben wurden (Tabelle 3).

15

Im Hinblick auf die Hydrolyse ist es am meisten bevorzugt, dass die neuen Häute nicht zugegeben werden, bis die alten Häute sich vollständig zersetzt haben und die Zellulasen in die Lösung freigesetzt worden sind.

20

Tabelle 3: Der Effekt des Stadiums der Zugabe der Häute auf die gesamte Hydrolyse (24 h)

| Stadium<br>der<br>Hautzugabe<br>(h) =<br>Hydr. Zeit | Reduzieren-<br>der Zucker<br>(g/l) | Glukose<br>(g/l) | Unlösliche<br>Trocken-<br>masse<br>(g/l) | Lösliche<br>Trocken-<br>masse<br>(g/l) |
|---|------------------------------------|------------------|--|--|
| 2   | 7,4                                | 4,3              | 15,6                                     | 47,6                                   |
| 4   | 9,3                                | 4,8              | 7,7                                      | 51,0                                   |
| 6   | 16,1                               | 8,2              | 5,5                                      | 52,1                                   |
| 24  | 22,4                               | 15,7             | 1,4                                      | 55,3                                   |

Effekt der Zellulase-Zugabe

Um eine geeignete Zellulase-Zugabe in einer semi-kontinuierlichen Hydrolyse zu finden, wurden zusätzlich zu der  $\beta$ -Glukosidase (1000 nkat/g Haut) Econase® 0,1, 0,5 und 1,0 FPU/g Haut in Verbindung mit jedem Wechsel der Lösung hinzugefügt. Wenn die Enzymzugabe 0,5 oder 1,0 FPU/g betrug, wurde die Hydrolyse für Wochen ohne irgendwelche reduzierten Zuckerausbeuten fortgesetzt. Die Glukosekonzentration betrug im Durchschnitt 22 g/l (63% der Trockenmasse), die Konzentration aller reduzierender Zucker 25 g/l (71% der Trockenmasse) und die lösliche Trockenmasse 33 g/l. Die Hydrolyse wurde nach 78 Tagen (Fig. 11 und 12) gestoppt. Während dieser Zeit trat kein Wachstum an Mikroorganismen oder Ablagerung an Fett in dem Hydrolysebehälter auf.

Der wirkliche Enzymverbrauch in einer Hydrolyse, wobei die Enzyme im Kreislauf gehalten werden, kann aus den Ergebnissen berechnet werden:

Die anfängliche Zugabe an Zellulase von 30 FPU/g Haut zu einer Charge jeden 150-igsten Tag.

Die Zugabe von Zellulase von 0,5 FPU/g Haut zu jeder Charge und die Zugabe von  $\beta$ -Glukosidase von 1000 nkat/g Haut zu jeder Charge.

Insgesamt: 0,7 FPU Econase® und 1000 nkat  $\beta$ -Glukosidase/g Haut.



Die Immobilisierung der  $\beta$ -Glukosidase in einem festen Träger.

5 Eine kontinuierliche Zugabe von löslicher  $\beta$ -Glukosidase zu der Hydrolysemischung erhöht die Enzymkosten beträchtlich. Da es keine kommerzielle  $\beta$ -Glukosidase gibt, die an einen festen für die kontinuierliche Verwendung geeigneten Träger gebunden ist, wurde die immobilisierte Enzymzubereitung hergestellt.

10

Die Bindung der Novo- $\beta$ -Glukosidase wurde im Hinblick auf fünf verschiedene Träger studiert. Die Immobilisierungsmischung enthielt 5 g mit Wasser gewaschenen Carrier, 49 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5 und 15 1,35 ml Enzym (2000 nkat/g Träger). Die Reaktionsmischungen wurden unter kalten Bedingungen (+4°C) für 24 Stunden leicht bewegt. Die Bindung des Enzyms wurde aus den Lösungen und den Trägern gefolgt. Die  $\beta$ -Glukosidase war am besten an einen schwachen 20 Kationenaustauscher gebunden. Das Enzym wurde mit Glutaraldehyd durch Quervernetzung gebunden, um die Stabilität des Trägers zu verbessern.

Immobilisierte  $\beta$ -Glukosidase (1000 nkat/g Haut) wurde in 25 einer semi-kontinuierlichen Hydrolyse der Wursthäute in drei Wochen zirkuliert, wobei diese wie ein lösliches Enzym funktionierte. Ohne irgendeine Glutaraldehydbindung wurde das Enzym ziemlich schnell von dem Träger freigesetzt. Auch drei verschiedene Mengen an 30 Glutaraldehyd behandelte  $\beta$ -Glukosidase (1000, 2000 und 3000 nkat/g Haut) wurden während eines Monats in der Hydrolyse ohne irgendeine Verminderung der Zuckerausbeuten im Kreislauf gehalten.

14.03.01

- 17 -

- In Fig. 13 ist der Effekt des Kreislaufs der immobilisierten  $\beta$ -Glukosidase auf die Ausbildung der löslichen Trockenmasse in einer semi-kontinuierlichen Hydrolyse der gebrauchten Wursthäute mit Econase®-Zellulase dargestellt. Anfänglich waren 50 g/l Häute vorhanden und die Enzymdosis betrug 30 FPU/g Häute. Alle 24 Stunden wurden neue Häute zu der Reaktionsmischung (50 g/l) hinzugefügt, die Zuckerlösung wurde wiedergewonnen und durch eine Zellulase enthaltende Pufferlösung (0,5 FPU/g) substituiert. Die immobilisierte  $\beta$ -Glukosidase, die mit Glutaraldehyd (1000-3000 nkat/g Haut) behandelt wurde, wurde nur zum Beginn der Reaktion hinzugefügt. Die Reaktionsbedingungen: 50°C, pH 5, Mischung 150 U/min.
- 15 Die Enzymkosten können unter Verwendung einer immobilisierten  $\beta$ -Glukosidase vermindert werden. Die gleiche Enzymcharge kann für einige Wochen oder Monate in einer kontinuierlichen Hydrolyse im Kreislauf gehalten werden.

20

14.03.01

Deutschsprachige Übersetzung der Patentansprüche  
5 der Europäischen Patentanmeldung Nr. 95 850 219.7  
des Europäischen Patents Nr. 0 718 406

10

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Zersetzung von Wursthäuten und anderen  
hauptsächlich zelluloseartigen Substanzen mittels einer  
Enzymlösung, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren  
15 folgende Verfahrensschritte umfasst:
- a) Zellulaseenzyme werden zu einem eine Wasserlösung  
enthaltenden Reaktor gegeben,
  - b) vor Stufe a) oder danach werden die zu lösenden  
20 Substanzen zu dem Reaktor zugegeben,
  - c) die zu lösenden Substanzen werden teilweise oder  
vollständig gelöst, danach
  - d) wird eine neue Menge der zu lösenden Substanzen zu  
dem Reaktor zugegeben,
  - 25 e) wenn die Enzyme in den neuen zu lösenden Substanzen  
adsorbiert worden sind, wird die in Stufe c)  
gelösten Substanzen enthaltende Lösung durch Tren-  
nung der Lösung und der zu lösenden Substanzen von-  
einander wieder gewonnen, wobei
  - 30 f) Wasser zu den zu lösenden Substanzen hinzugegeben  
wird und wenn gewünscht, werden die Stufen c-f eine  
gewünschte Anzahl von Malen wiederholt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
35 dass die Enzyme Zellulasen sind.

14.03.01

- 2 -

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellulasezubereitungen Ekonase<sup>®</sup> CE, Spezyme CE<sup>®</sup> und/oder Spezyme CP<sup>®</sup> sind.
- 5 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrolysezeit durch die Konzentration der Häute und die Konzentration der Enzyme eingestellt wird.
- 10 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrolysezeit 2 - 5 Stunden beträgt, wenn die Konzentration der Häute ca. 0 - 100 g/l und die Konzentration der Enzyme 1 - 50 FPU/g Häute beträgt.
- 15 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge des Zellulaseenzym in der Lösung 1 - 50 FPU/g Haut beträgt.
- 20 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, dass auch  $\beta$ -Glukosidase zu dem Verfahren hinzugegeben wird, um die Hydrolyse auszuführen, wenn eine größere Menge der Glukose erwünscht ist.
- 25 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die  $\beta$ -Glukosidase immobilisiert ist, um dieselbe in den Kreislauf zurückzuführen.
- 30 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge der immobilisierten  $\beta$ -Glukosidase ca. 1000 nkat/g Häute beträgt.
10. Verfahren nach Ansprüchen 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den Zugaben der Häute oder in

14.03.01

- 3 -

Verbindung mit diesen, die benötigte Menge an Zellulaseenzymen und  $\beta$ -Glukosidase hinzugefügt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Hautkonzentration 10 - 200 g/l beträgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren als ein Chargenverfahren unter Verwendung eines, zwei oder mehrerer Reaktoren ausgeführt wird.

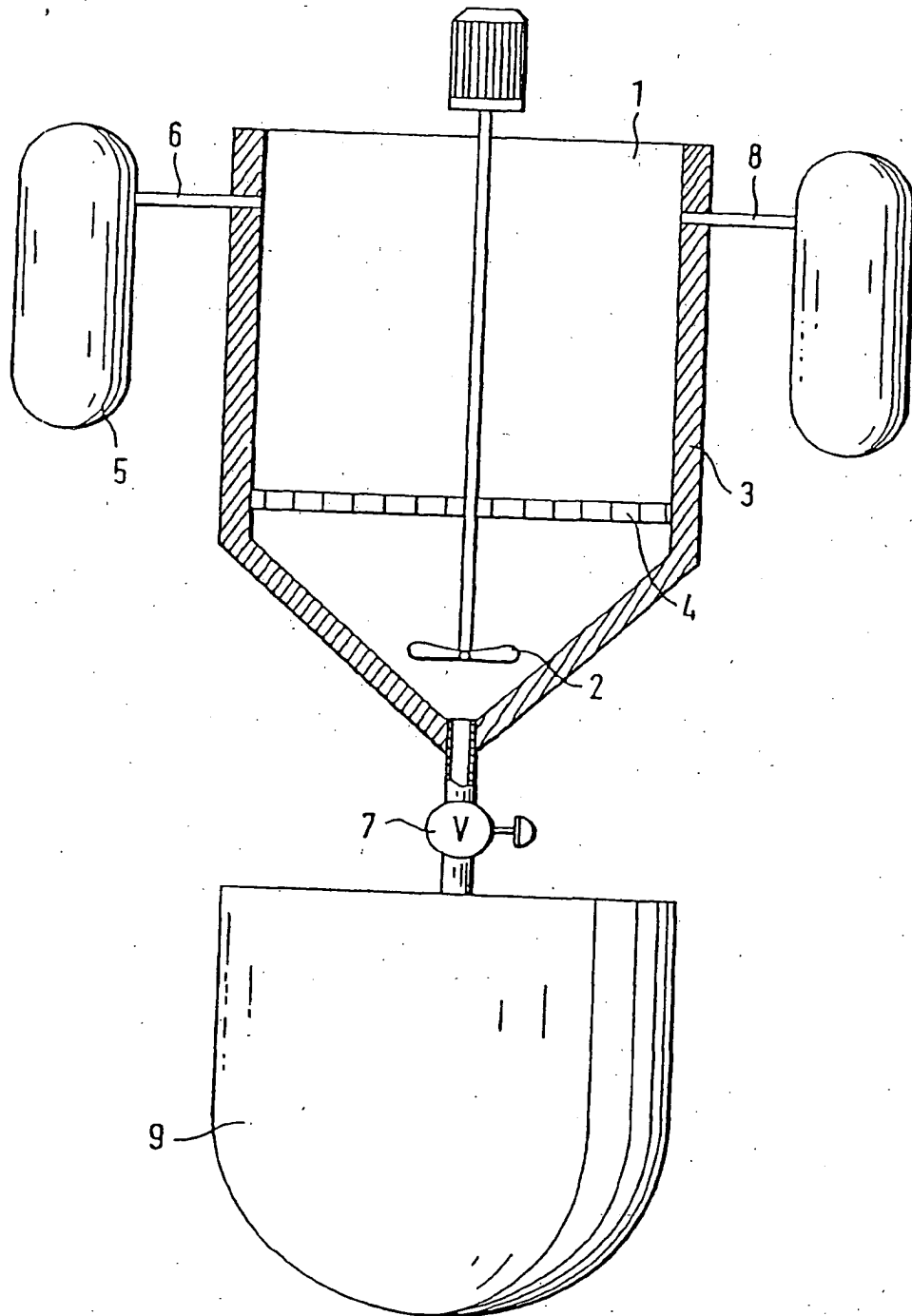


FIG. 1

14.03.01

2/13

## ZERSETZUNG DER WURSTHÄUTE

### 2. ZERSETZUNG MIT KREISLAUF DER ENZYME

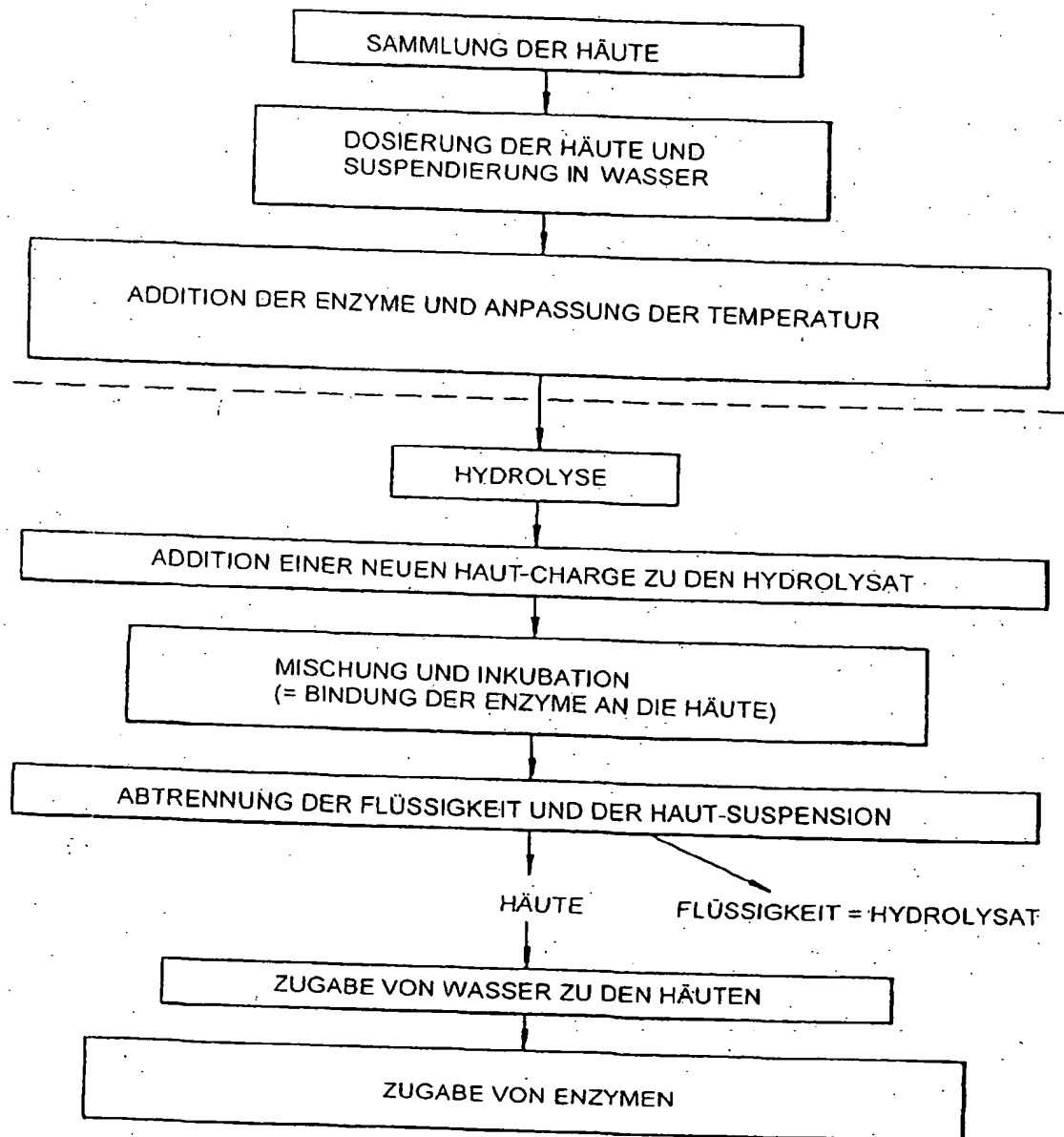


FIG. 2

14.03.01

3/13

# ZERSETZUNG DER WURSTHÄUTE

## 1. ZERSETZUNG OHNE KREISLAUF DER ENZYME

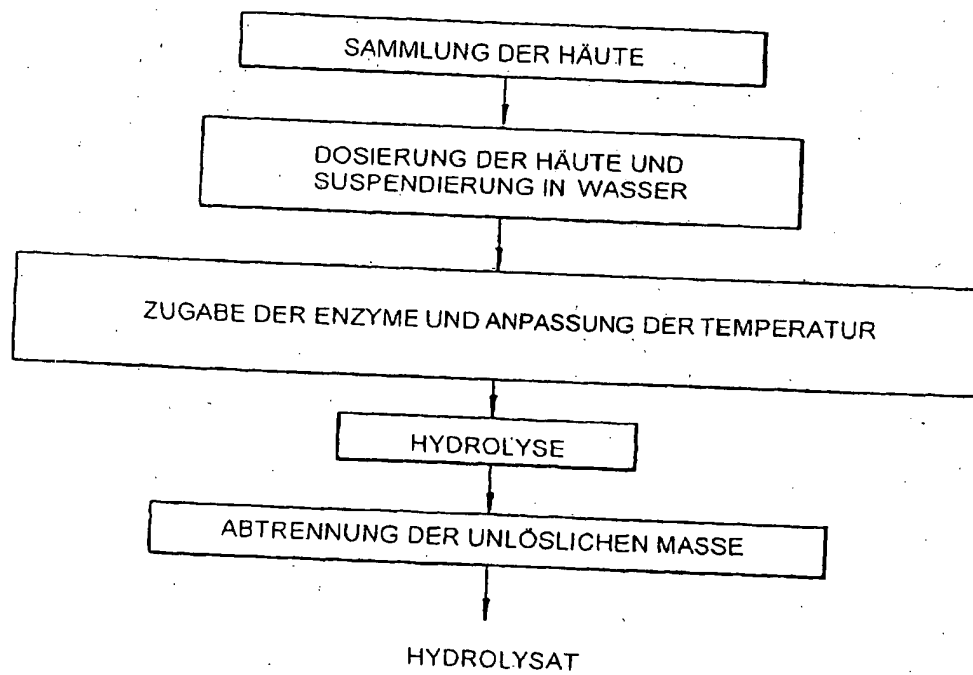


FIG. 3



FIG. 4a

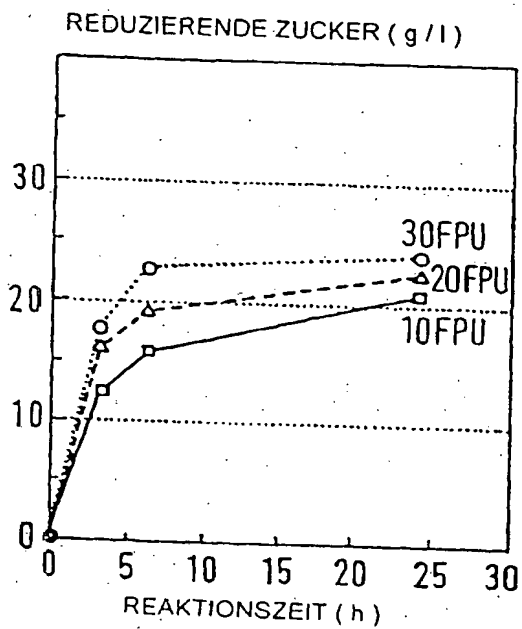


FIG. 4b

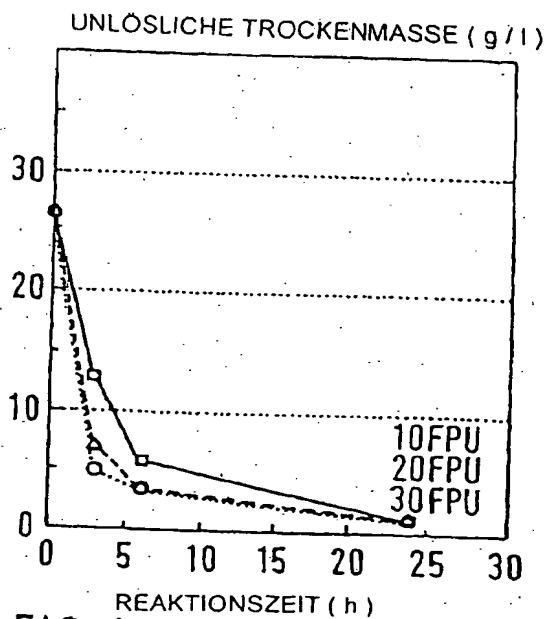
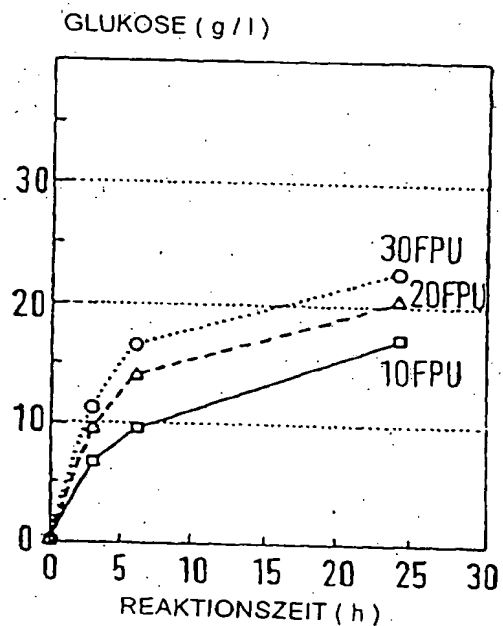


FIG. 4c

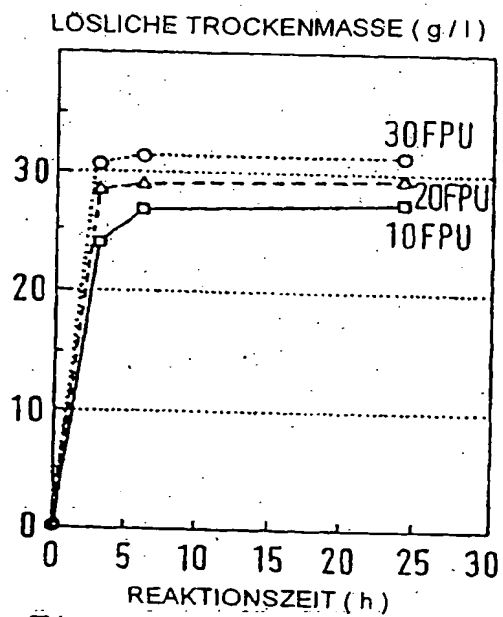


FIG. 4d

14.03.01

5/13

FIG. 5a

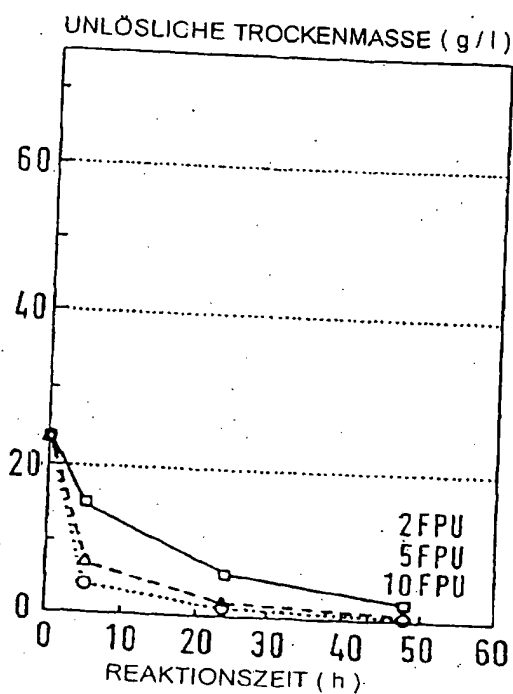


FIG. 5b

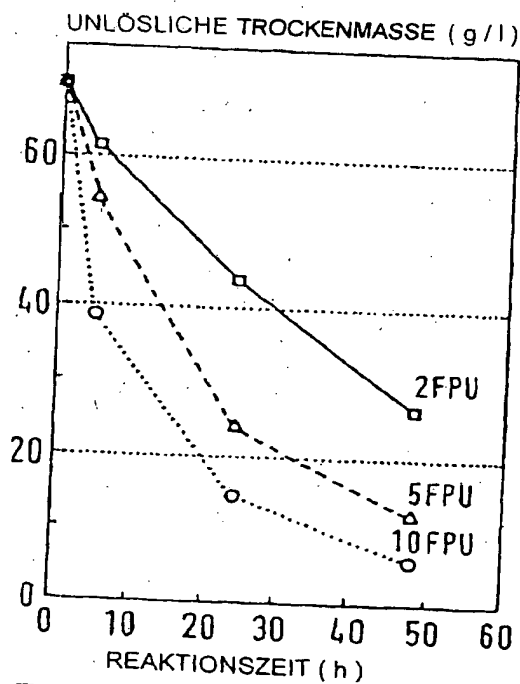
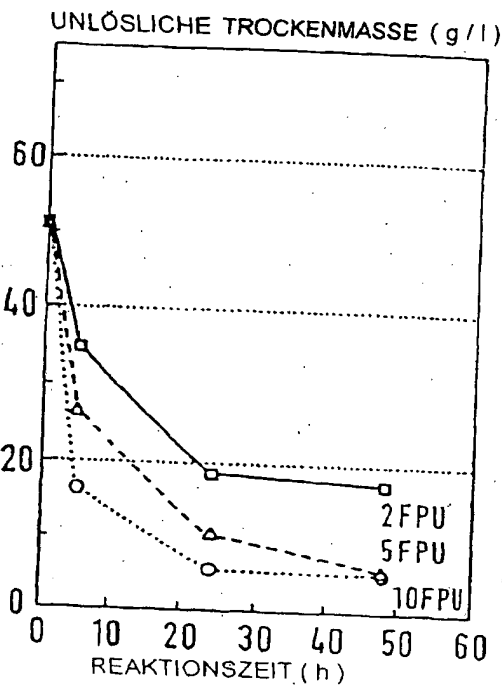


FIG. 5c

14.03.01

6/13

FIG. 6a

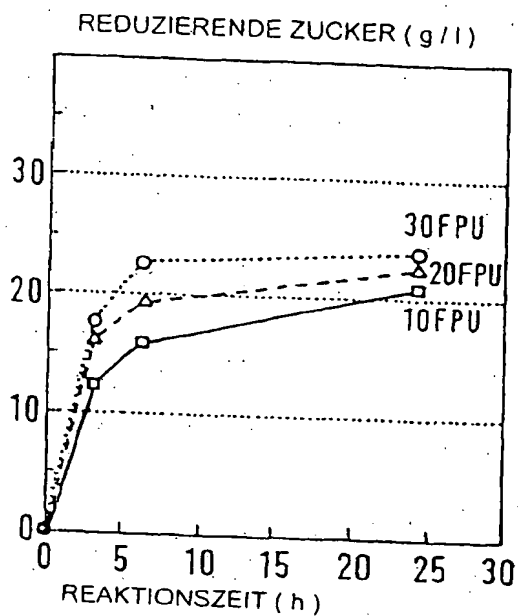


FIG. 6b

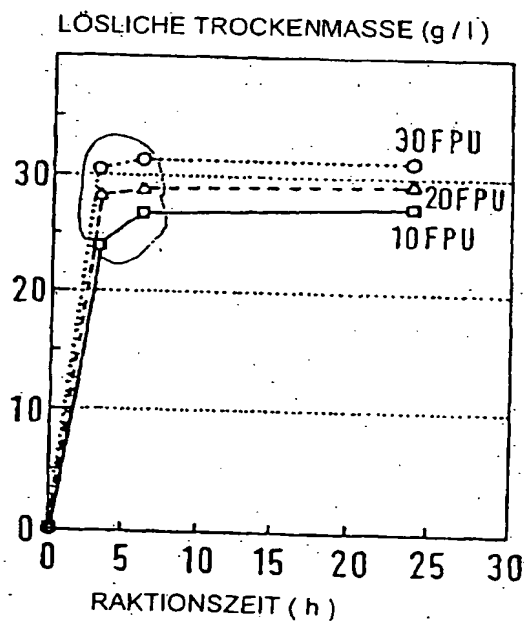
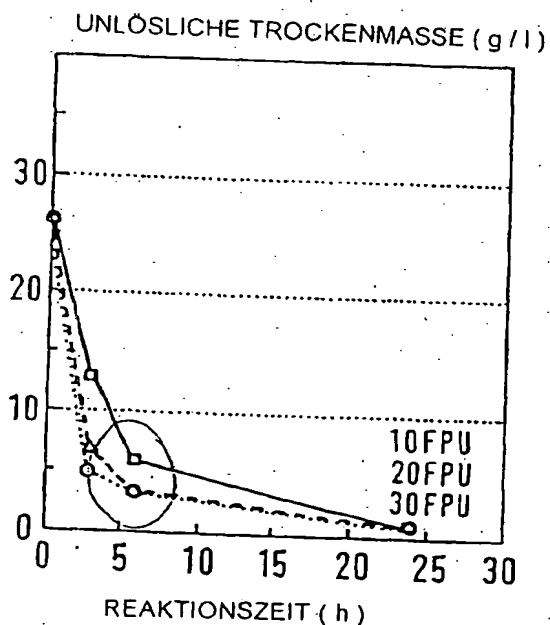
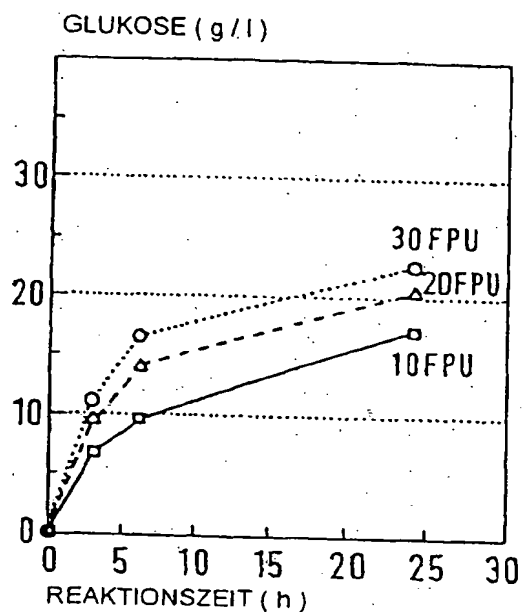


FIG. 6c

FIG. 6d

14.03.01

7/13

FIG. 7a

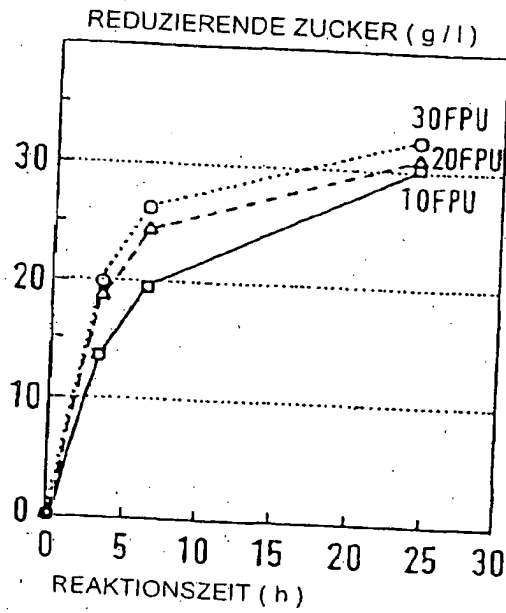


FIG. 7b

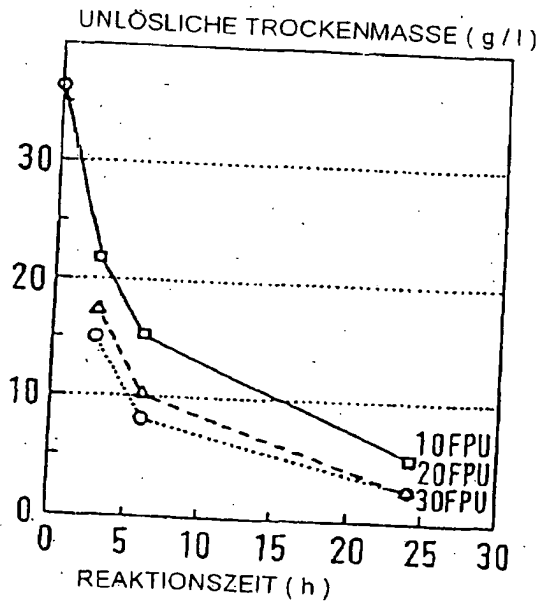
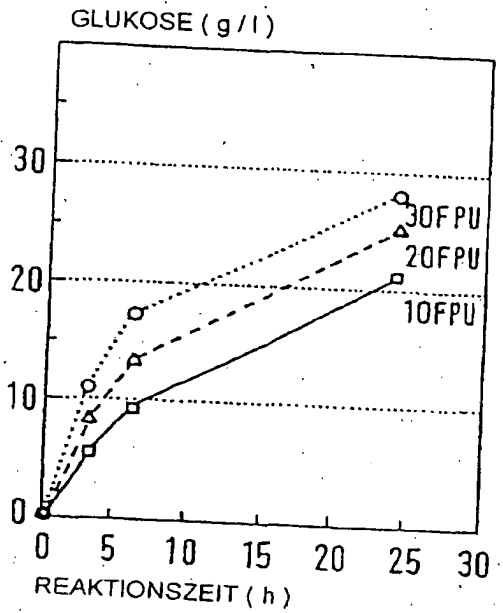


FIG. 7c

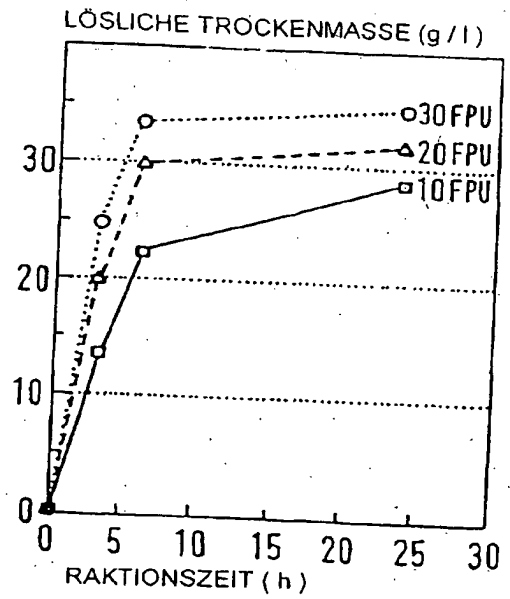


FIG. 7d

14.03.01

8/13

FIG. 8a

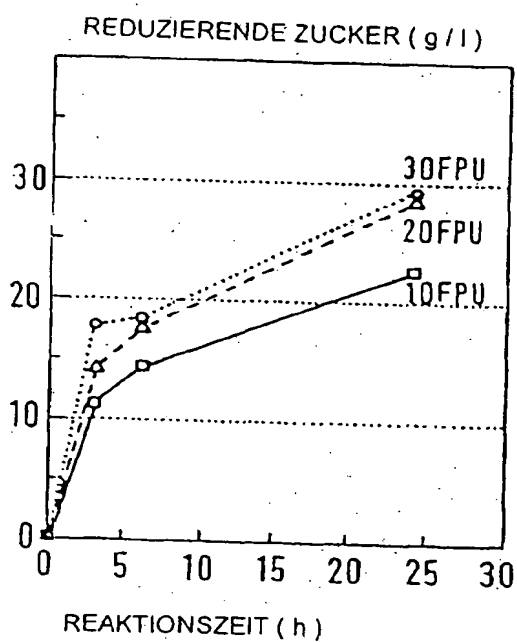


FIG. 8b

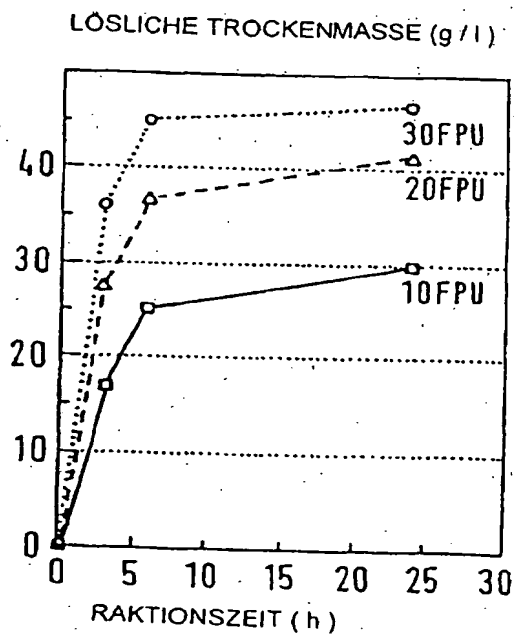
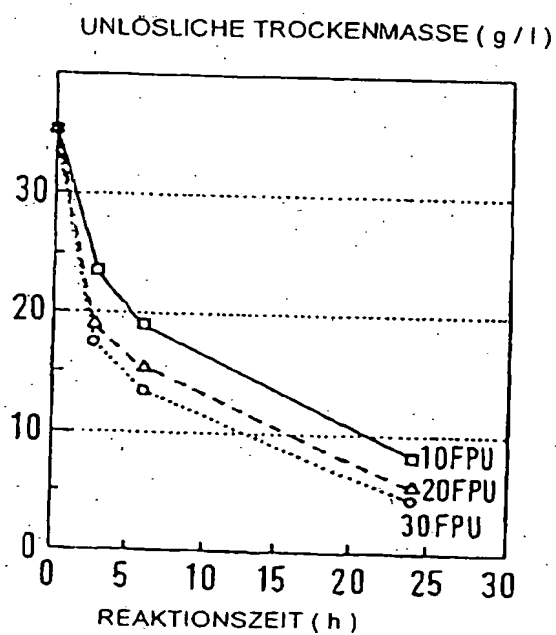
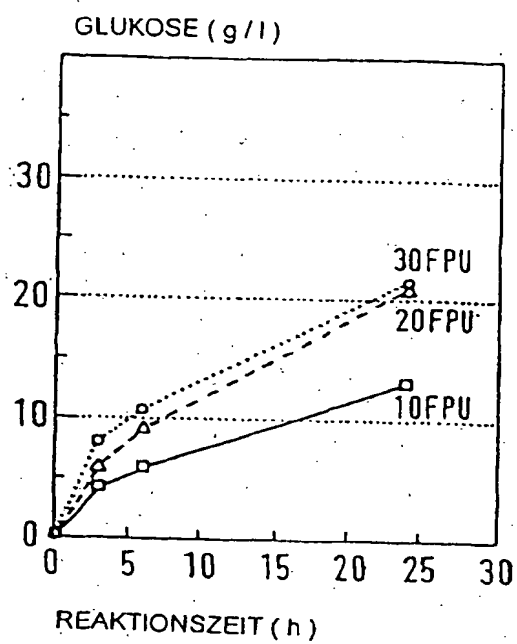


FIG. 8c

FIG. 8d

14.03.01

9/13

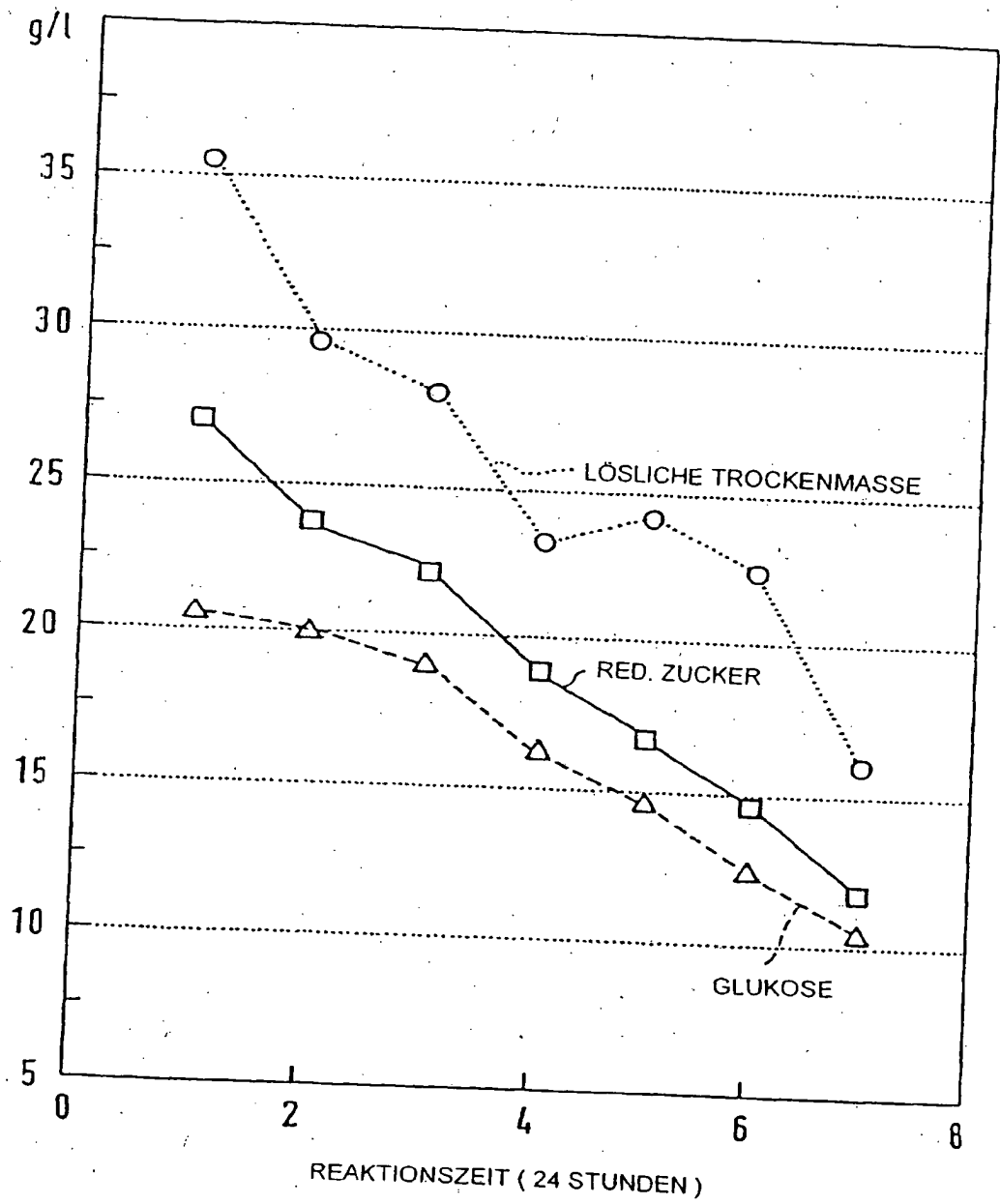


FIG. 9

14-03-01

10/13

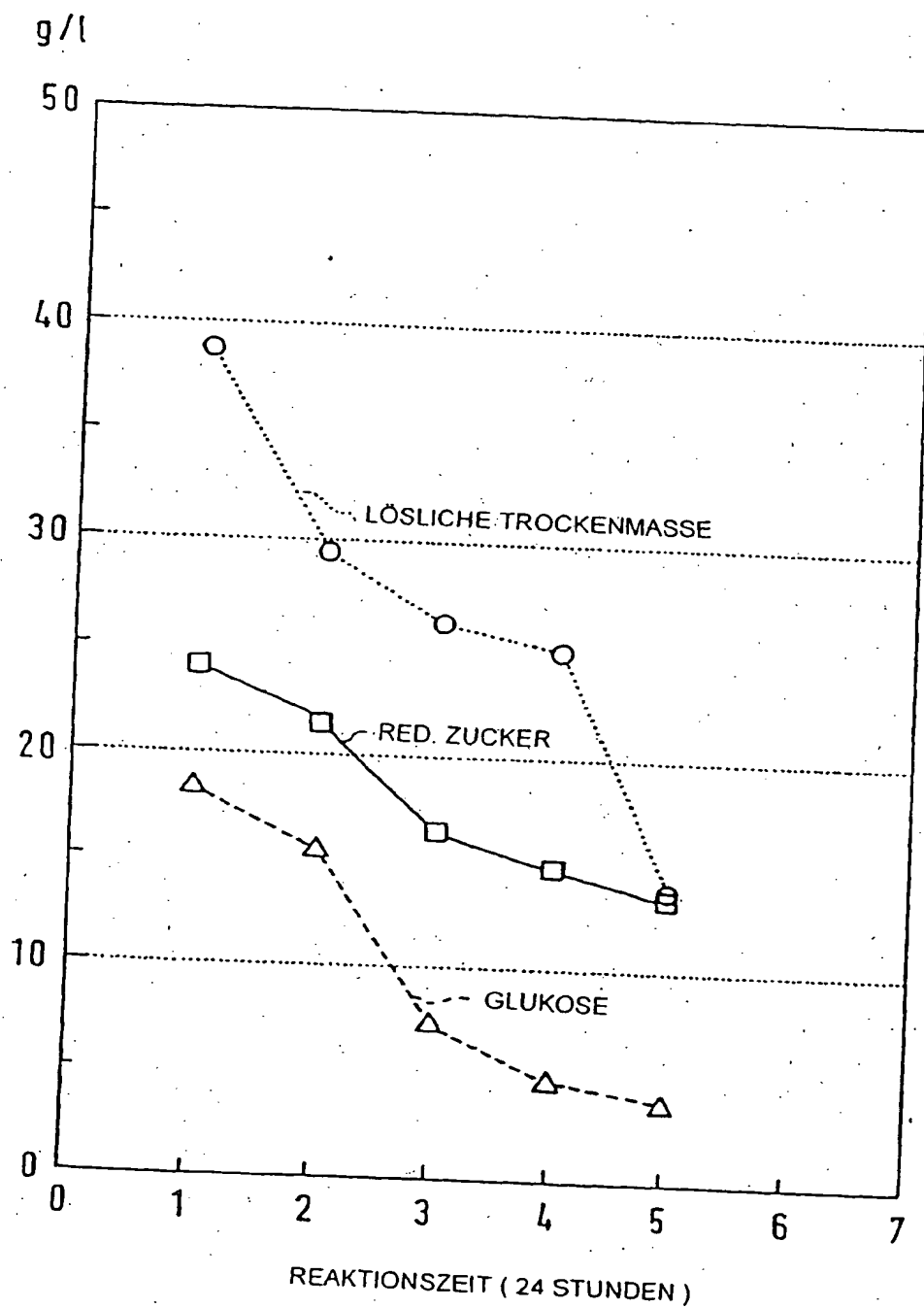


FIG. 10

14.03.01

11/13

SEMI-KONTINUIERLICHE HYDROLYSE DER GEBRAUCHTEN WURSTHÄUTE MIT ALKO-ECONASE

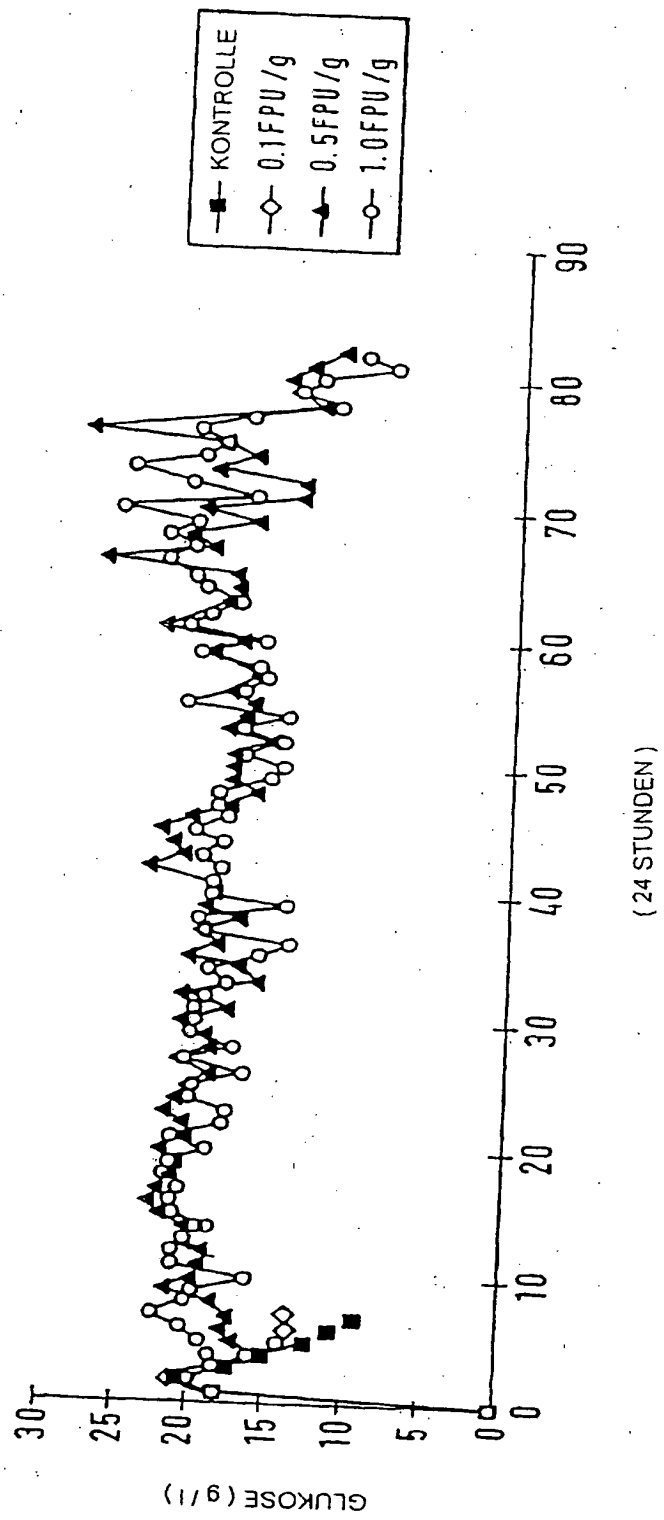


FIG. 11



14.03.01

12/13

SEMI - KONTINUIERLICHE HYDROLYSE DER GEBRAUCHTEN WURSTHÄUTE MIT ALKO-ECONASE

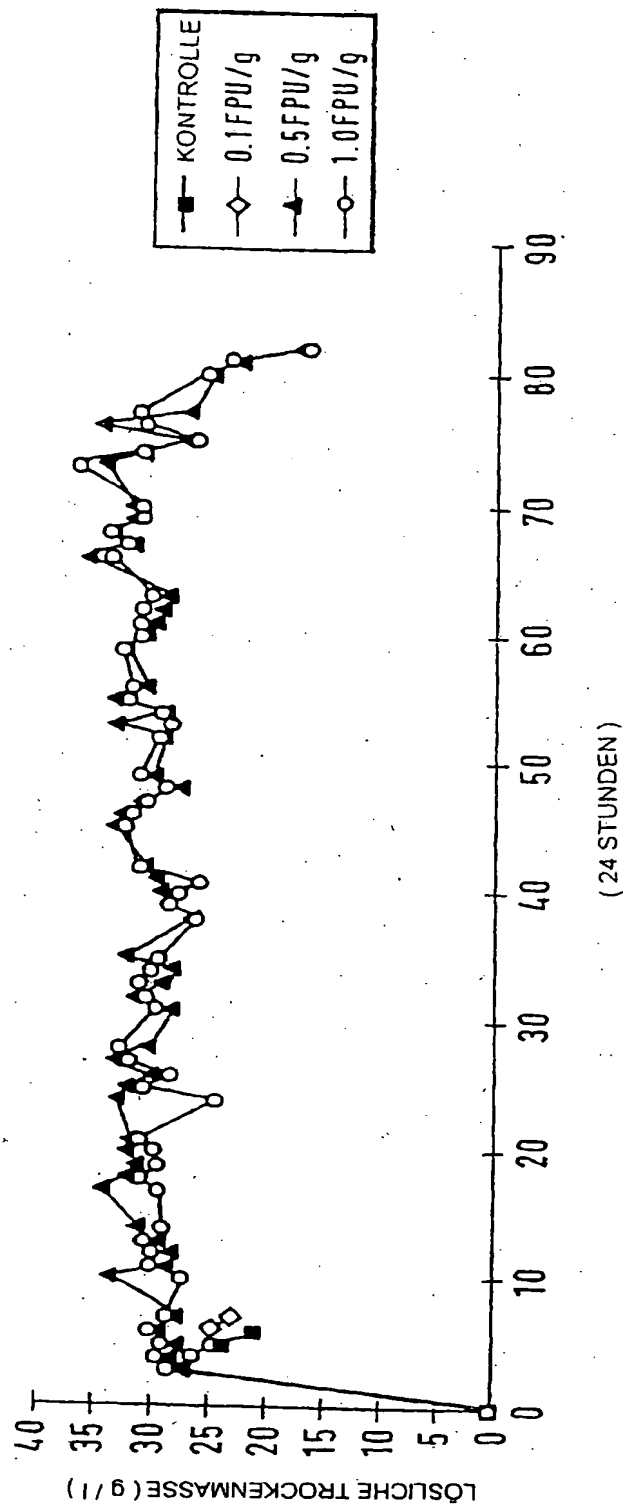


FIG.12

SEMI - KONTINUIERLICHE HYDROLYSE DER GEBRAUCHTEN WURSTHÄUTE  
MIT EINER IMMOBILISIERTEN  $\beta$ -GLUCOSIDASE

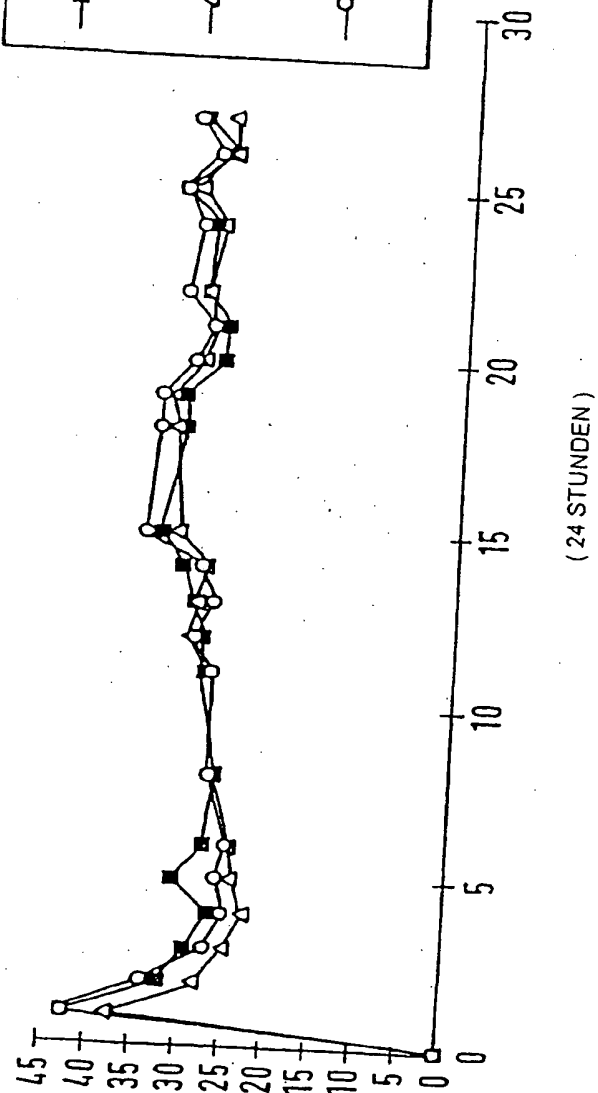


FIG. 13